

山西药科职业学院课题成果公报

公报登记号：SXYK201907

单位名称：山西药科职业学院

课题名称：黄芩花中黄酮类物质的分离及结构测定

课题负责人：李宝霞 讲师 山西药科职业学院

课题批准号：20151118

课题成员：董双涛等

正文：

一、内容与方法

（一）研究内容

本课题的研究内容：

1. 基础研究：近年来，中药材的安全性问题日益凸显，有害元素是影响中药材安全性的重要内容之一。因此测定不同产地黄芩花中的有害元素对于其安全性评价以及限度标准的制定有重要意义。样品微波消解后，采用电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）测定了 Cu、Cd、Pb、As、Hg，并进行了方法学验证。结果表明，Cu、Cd、Pb、As 在 $0.5 \sim 100 \mu\text{g/L}^{-1}$ 范围内，Hg 在 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/L}^{-1}$ 呈良好的线性关系， $r \geq 0.9950$ ，精密度、稳定性和重复性均符合测定要求，加样回收率在 $95.24\% \sim 101.16\%$ 。可得出结论，不同产地的黄芩花中的有害元素均符合我国药典的相关规定。

本研究可为黄芩花的安全性评价提供依据。

2. 黄芩花总黄酮提取工艺研究及槲皮素和山奈酚分离纯化

通过单因素试验及正交试验探讨总黄酮提取工艺；采用大孔吸附树脂柱，硅胶柱及薄层制备纯化槲皮素和山奈酚。得到黄芩花总黄酮提取工艺为：20 倍量 70%乙醇回流提取 3 次，每次 45min；得到 HPLC 纯度为 90.1%的槲皮素和 HPLC 纯度为 95.3%的山奈酚。采用该提取工艺简便，两黄酮醇类化合物纯化方法简单，重现性好。

(二) 研究方法

1 黄芩花总黄酮提取工艺

1.1 总黄酮含量测定 照前期山西省中药材地方标准研究编制专项所制订黄芩花质量标准^[3]，即以芦丁为对照品，进行 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)\text{-NaOH}$ 显色反应，在 505nm 处测定黄芩花总黄酮含量。

求得芦丁标准曲线回归方程： $A=13.61C-0.036$ （ $r=0.9991$ ），结果显示芦丁在 $9.7\sim 72\ \mu\text{g/ml}$ 线性关系良好。

1.2 黄芩花总黄酮提取工艺考察

分别精密称取 5g 黄芩花药材，进行单因素实验。

1.2.1 提取溶剂的选择

表 1 不同提取溶剂对总黄酮提取量的影响

序号	1	2	3	4	5
溶剂	水	甲醇	乙醇（95%）	乙酸乙酯	丙酮
总黄酮(mg)	212	242	239	209	201

综合考虑毒性原因，采用乙醇为提取溶剂。

1.2.2 提取方法选择

表 2 不同提取方法对总黄酮提取量的影响

序号	1	2	3
提取方法	渗漉	回流	超声
总黄酮(mg)	226	242	221

采用回流提取法。

1.2.3 黄芩花总黄酮提取工艺正交实验设计

在单因素考察的基础上，设计因素水平表（表 3），正交试验设计结果见表 4。

表 3 黄芩花总黄酮提取正交实验设计

因素 水平	提取次数 (A)	乙醇浓度 (B)	溶剂用量 (倍) (C)	提取时间 (min) (D)
1	1	95%	10	30
2	2	70%	20	45
3	3	50%	30	60

表 4 黄芩花总黄酮提取工艺正交试验方案及试验结果

序号	提取次数 (A)	乙醇浓度 (B)	溶剂用量 (倍) (C)	提取时间 (min) (D)	总黄酮量 (mg)
1	1	95%	10	30	205
2	1	70%	20	45	245
3	1	50%	30	60	201
4	2	95%	20	60	206
5	2	70%	30	30	232
6	2	50%	10	45	202
7	3	95%	30	45	223
8	3	70%	10	60	219
9	3	50%	20	30	214

表 5 $L_9(3^4)$ 正交表

因素 试验号	提取次数 (A)	乙醇浓度 (B)	溶剂用量 (倍) (C)	提取时间 (min) (D)	总黄酮量 (mg)
1	1	1	1	1	205
2	1	2	2	2	245
3	1	3	3	3	201
4	2	1	2	3	206
5	2	2	3	1	232
6	2	3	1	2	202
7	3	1	3	2	223

8	3	2	1	3	219
9	3	3	2	1	214
K1	217.000	211.333	208.667	217.000	
K2	213.333	232.000	221.667	223.333	
K3	218.667	205.667	218.667	208.667	
R	5.334	26.333	13.000	14.666	

表 6 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值
提取次数	44.667	2	0.099	4.460
乙醇浓度	1152.667	2	2.561	4.460
溶剂用量	278.000	2	0.618	4.460
提取时间	324.667	2	0.721	4.460
误差	1800.00	8		

直观分析表明：影响因素的主次顺序为乙醇浓度（B）>提取时间（D）>溶剂用量（倍）（C）>提取次数（A）。方差分析结果为：A 因素、B 因素、C 因素及 D 因素均无明显差异。最佳提取工艺条件为： $A_3B_2C_2D_2$ 。

2 黄酮醇类化合物分离纯化

2.1 总黄酮提取

取黄芩花干燥花蕾 2.5kg, 照 $A_3B_2C_2D_2$ 工艺提取, 提取液合并, 减压回收乙醇至无醇味, 得提取液 2000ml, 加 2 倍量水分散, 静置沉淀, 上清液浓缩至 3500ml。依次用乙酸乙酯, 正丁醇萃取。得乙酸乙酯部干膏 61g, 正丁醇部干膏 43g。

2.2 正丁醇部 HPLC 成分分析

照前期山西省中药材地方标准研究编制专项中含量测定方法: 经分析, 正丁醇部无两种目标成分, 本题中暂不做进一步分离。

2.3 乙酸乙酯部化合物的分离

乙酸乙酯部干膏加 10 倍量 70%乙醇溶解，上清液上大孔树脂柱，湿法上样，蒸馏水洗至盐酸镁粉反应呈阴性。依次用 30%乙醇 (Fr1)、40%乙醇 (Fr2)、50%乙醇 (Fr3)、60%乙醇 (Fr4)、70%乙醇 (Fr5)、80%乙醇 (Fr6)、95%乙醇 (Fr7) 洗脱。TLC 检识联合 HPLC 鉴别，槲皮素及山奈酚主要集中在 Fr5 (干膏 20.5g)。

Fr5 部经 100 目~200 目硅胶柱色谱分离，以二氯甲烷-甲醇系统 (体积比 60:1~2: 1) 梯度洗脱，每 250ml 收集一次，TLC 检识联合 HPLC 鉴别，槲皮素及山奈酚分别集中在 Fr8-4 (10.2mg)，见图 1；Fr8-5 (5.3mg)，见图 1。

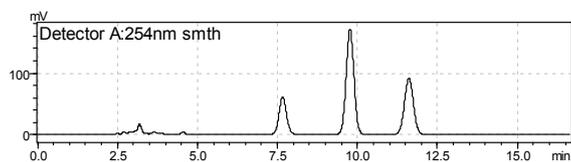


图 1 Fr8-4HPLC 图谱

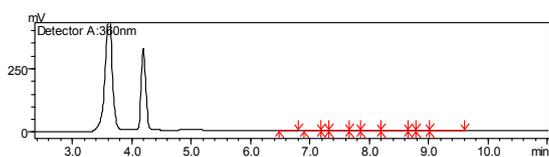


图 2 Fr8-5HPLC 图谱

Fr8-4 经葡聚糖凝胶反复制备得化合物 1。Fr8-5 经薄层制备，展开剂甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (10:4:1)，得化合物 2，分离路线见图 3。

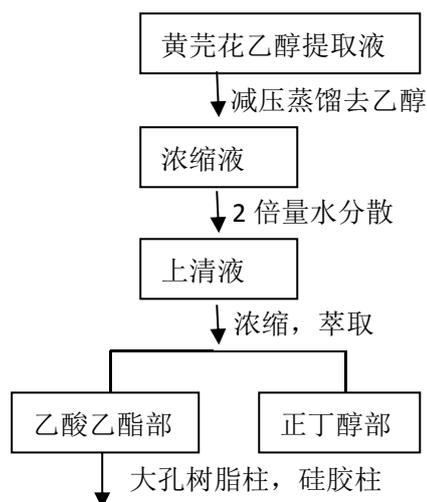
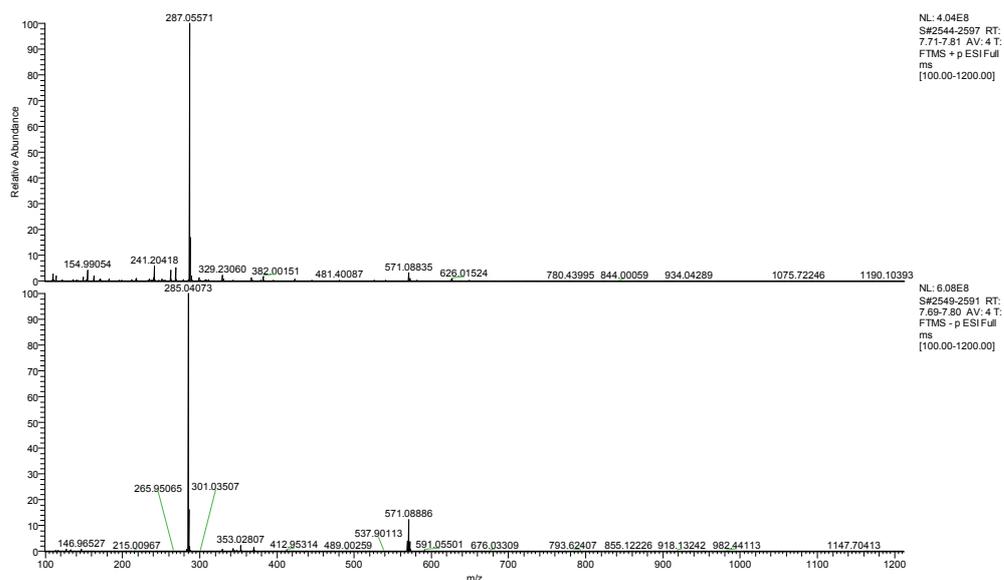


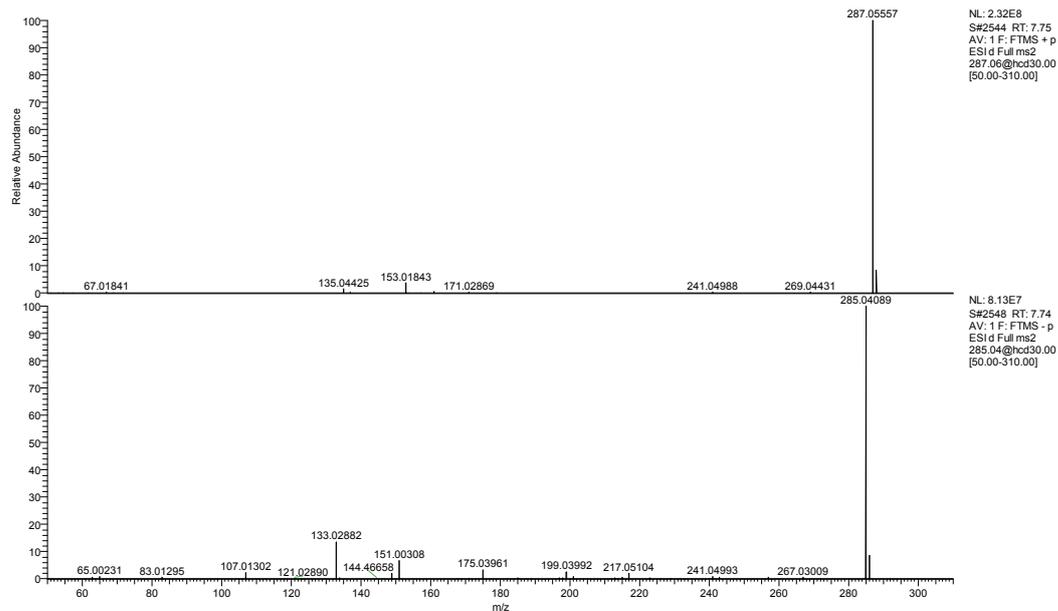
图 3

黄芩花中黄酮醇类化合物提取分离流程图

所得两种单体成分,采用加标准品确认法,分别加入槲皮素及山奈酚对照品。经 HPLC 分析确认,化合物 1 保留时间及色谱峰与槲皮素对照品完全一致(图 7),化合物 2 保留时间及色谱峰与山奈酚对照品完全一致。

化合物 2 经超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS),得如下谱图:





与文献报道山萘酚谱图一致，进一步确认化合物 2 为山萘酚。

二、结论与对策

1. 设计出槲皮素和山萘酚提取工艺

2. 测定了 14 种无机元素，包括 5 种有害元素及其他 9 种元素，并进行了方法学验证。采用 SPSS 聚类分析和主成分分析对其特征元素进行了评价。

三、成果与影响

课题研究的过程中，课题组完成了两篇论文的撰写，《不同产地黄芩花中的 5 种有害元素测定及其无机元素的主成分分析和聚类分析》《微波消解 ICP-MS 法测定不同产地黄芩花中的五种有害元素》是本课题的研究成果，同时也是课题研究的理论支撑。

这些论文的发表为黄芩花中黄酮类化合物的研究提供理论借鉴。

四、改进与完善

通过本实验设计到完成的实践过程，意识到：设计实验方案需根据实验方法，实验目的充分考虑到原植物是否容易获得。尤其对于提前分离实验，需要大批量的原植物，所以首先要确保原植物来源有保障。